

氏名	山口 雪子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第1914号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	タバコ培養細胞におけるアルミニウム障害ならびに防御機構 に関する研究
論文審査委員	教授 松本 英明 教授 木村 和義 教授 野田 和彦

学位論文内容の要旨

タバコ細胞においてアルミニウム(Al)は鉄(Fe)依存性脂質過酸化反応を促進し、細胞死を引き起こす。この細胞死は、アポトーシスを特徴づける細胞質の凝集や核DNAの断片化が観察され、細胞外 Ca^{2+} と細胞内プロテアーゼに依存していた。従って、Alと Fe^{2+} による細胞死はアポトーシス様細胞死の可能性が高い。またAl処理により、細胞内グルタチオン(GSH)含量が低下し酸化型GSH(GSSG)含量が増加すること、GSH含量の低下はAl処理に伴う増殖阻害や膜機能低下より早く起こることが分かった。さらにGSH合成阻害剤を用い調製した低GSH細胞は、Al感受性が高く脂質過酸化量も増大していた。一方、細胞の増殖状態とAl感受性を検討した結果、最も高いAl感受性を示す対数増殖期初期は一過的な著しい低GSH状態であること、Al耐性を示す定常期やリン酸欠乏細胞はGSH還元酵素活性が高くGSH/GSSG比をAl処理後も高く維持していることが分かった。従って、Al障害特に脂質過酸化の促進に対する防御機構にGSHとその代謝系が深く関与している可能性が高い。

論文審査結果の要旨

本研究ではタバコ培養細胞に対する Al 障害の機構を解析すると共に、細胞の Al 毒性に対する防御機構を解明することを目的とした。

まず始めに Al と Fe^{2+} による細胞死がアポトーシスである可能性について検討した。その結果、Al 処理細胞では細胞質の萎縮が認められた。さらに、TUNEL 法により、核 DNA の断片化を示す蛍光標識がより強く認められ、特に DAPI 染色が弱い核でその傾向が強かった。アガロース電気泳動の結果、約 150bp の整数倍の大きさを持つ DNA のはじご状の断片化が Al 濃度依存的に増加した。次にアポトーシスの発現過程に関与するとされる Ca^{2+} およびプロテアーゼに着目し、Al 処理における脂質過酸化ならびに細胞死への影響を検討した。タバコ培養細胞に見られる Al と Fe^{2+} による細胞死において、細胞死の原因である脂質過酸化の増大に細胞外 Ca^{2+} が関わり、さらに脂質過酸化から細胞死に至る過程でプロテアーゼが関与することを示唆した。以上の形態学的特徴および生化学的検討結果から、Al と Fe^{2+} によるタバコ培養細胞の死はアポトーシスと呼ばれるプログラム細胞死である可能性が高いことを明らかにした。

Al 毒性に対する防御機構について検討するため、細胞内抗酸化物質の 1 つであるグルタチオン (GSH) について、Al による細胞毒性に対する細胞内 GSH の効果を対数増殖期の細胞を用いて検討した。Al による総 GSH 含量の増加抑制は処理後 6 時間目から認められ、増殖能の低下や原形質膜障害の指標である Evans blue の取り込みの開始前に起こっていた。これらの結果は、細胞内の GSH が Al と Fe^{2+} による脂質過酸化反応の抑制に関与し細胞死から細胞を防御している可能性を強く示唆した。

Al 耐性を示す細胞では総 GSH 含量は約 20nmol/100 mg FW cells と Al 感受性を示す対数増殖期中期の細胞と変わらなかったが、GR 活性が増加し、GSH/GSSG 比を高く維持していることが明らかとなった。

本研究によって、タバコ培養細胞の栄養培地中での Al 障害は Fe 依存性脂質過酸化の増大によるアポトーシス様細胞死であること、ならびにその防御機構には細胞内 GSH とその代謝系が深く関与していることが明らかとなった。得られた知見は、この分野の研究に新たな展開をもたらすものであり高く評価される。

本論文の内容、論文発表会、参考論文を総合的に審査した結果、本論文は博士 (農学) の学位に値するものと認められる。